

## 要 約

花色素の中で最も広く分布し、多彩な色を作り出しているものは、フラボノイドのグループに属するアントシアニンである。アントシアニンは、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンから、フェニルプロパノイド代謝系に含まれる経路を経て合成される。最初の安定なアントシアニンであるアントシアニン 3-グリコシド (3G) は多くの植物種に共通する経路で合成される。アントシアニン 3G 合成後、植物種ごとにメチル化や配糖化、アシル化などの様々な修飾が施されるため、多種多様な構造のアントシアニンがもたらされる。このアントシアニンの構造の多様性が、植物の多彩な花色の発現に貢献しているのである。そのため、花色育種を促進するには、アントシアニン生合成の詳細な知見の蓄積が重要となる。そこで、*Iris* 属の代表的な園芸種であるダッチアイリスのアントシアニン生合成を分子遺伝学的に解析し、花色育種を促進するために本研究を遂行した。本研究により得られた成果を要約すれば以下のとおりである。

まず、ダッチアイリスの品種、「ブルーダイヤモンド」花蕾の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、カルコンシンターゼ (*IhCHS*)、カルコンイソメラーゼ (*IhCHI*)、フラボノイド 3-ヒドロキシラーゼ (*IhF3H1~3*)、アントシアニンシンターゼ (*IhANS*)、ジヒドロフラボノール 4-レダクターゼ (*IhDFR*) およびアントシアニン 3-グルコシルトランスフェラーゼ (*Ih3GT*) cDNA クローンの単離に成功し、その特性を Table 2-1 にまとめた。さらに、*IhCHI*、*IhF3H*、*IhANS*、*Ih3GT*、*Ih5GT*(アントシアニン 5-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子) および *Ih3AT* (アントシアニン 3-アシルトランスフェラーゼ遺伝子) の 7つのアントシアニン生合成遺伝子について、「ブルーダイヤモンド」花卉発達段階におけるその発現を RT-PCR により解析した。その結果、これらの遺伝子の発現は蕾から開花直前まで徐々に上昇し、開花段階で急激に減少した。また、各遺伝子は葉、外花被、内花被、雌蕊、雄蕊の各器官における調査では、外花被、内花被および雌蕊におい

て高い発現レベルを示した。これらの遺伝子の発現パターンは、アントシアニンの蓄積量とよく対応しており、アントシアニン生合成がそれぞれの生合成を触媒する酵素遺伝子の転写レベルで制御されていることが示唆された。

次に、青紫色花品種、「ブルーダイヤモンド」(内、外両花被および雌蕊とも青紫)、白色花品種「White Wedgewood」(内、外両花被および雌蕊とも白) および複色花品種「Surprise」(外花被および雌蕊が白、内花被が薄紫) を用いて、外花被、内花被および雌蕊における *IhCHI*、*IhF3H*、*IhANS*、*IhDFR*、*Ih3GT*、*Ih5GT* および *Ih3AT* 遺伝子の発現解析を RT-PCR により行った。その結果、「White Wedgewood」では *DFR* 遺伝子発現が外花被と雌蕊で欠損し、内花被で顕著に減少していた。一方、「Surprise」ではアントシアニン生合成遺伝子全体の発現が減少しており、特に *DFR* 遺伝子発現の減少が外花被と雌蕊で顕著であった。

本実験で単離したアントシアニン生合成遺伝子のうち、アントシアニンとフラボン生合成の分岐点に位置する *F3H* cDNA、アントシアニンの安定性に重要である *3GT* cDNA を大腸菌において異種発現させ、その酵素特性を明らかにした。さらに、分子遺伝学的知見がこれまでほとんど得られていないアントシアニンのメチル化に関与する *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) をコードしている cDNA クローンの単離とその機能解析も試みた。まず、*F3H* cDNA についてみると、大腸菌において発現させた *IhF3H* のすべて (*IhF3H1* ~3) は、およそ 40 kDa であり、推定アミノ酸配列より算出された分子質量 (40,996、41,138 および 41,117 Da) と一致していた。基質として *naringenin* を用いたアッセイにより、すべての発現タンパク質が *naringenin* の 3 位の水酸化を触媒する機能を持つことが示された。また、活性が高かった *IhF3H1* および *IhF3H2* を用いて種々のフラバノンに対する基質特異性を分析したところ、これらの酵素は分析したフラバノンのほぼすべてに活性を示したが、その A 環 7 位の *O*-メチル化が *F3H* 活性を大幅に減少させる傾向が認められた。さらに、*IhF3H* はペチュニア *F3H* の機能と非常に類似していることが指摘された。

次いで、*IhF3H* と同様の手法にて発現させた *Ih3GT* は、分子質量約 50 kDa であり、*Ih3GT* cDNA の推定アミノ酸配列より算出されたタンパク質の推定分子質量 (49,558 Da)

と一致していた。また、酵素活性の分析により、*Ih3GT* cDNA が UDP-グルコースからアントシアニジンの 3 位へグルコシル基を転移する機能を持った、アントシアニン 3-*O*-グルコシルトランスフェラーゼをコードしていることが確認された。さらに、*Ih3GT* の異種発現タンパク質は、調査したアントシアニジンの種類に関係なく活性を有することが明らかになった。

植物の *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) は、フラボノイドやフェニルプロパノイドなどの二次代謝産物のメチル化に重要な役割を担っている。ダッチアイリス花蕾の cDNA ライブラリーより、*IhOMT1* および *IhOMT2* の 2 つの cDNA のクローンの単離に成功した。*IhOMT1* cDNA は推定分子質量 40,193 Da、pI 5.54 を示す 365 のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードする ORF を有していた。一方、*IhOMT2* cDNA は推定分子質量 40,385 Da、pI 5.50 を示す 369 のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードする ORF を有していた。また、*IhOMT1* と *IhOMT2* との同一性は、31.5 %であった。大腸菌において発現させた *IhOMT1* および *IhOMT2* の分子質量は約 40 kDa であり、前述の推定分子質量と一致していた。組換え *IhOMT1* を用いた酵素機能の解析により、*IhOMT1* cDNA が、SAM からカフェ酸 3 位へのメチル基の転移を触媒し、フェルラ酸をもたらす、SAM 依存性 COMT をコードすることが示された。さらに、その至適 pH は 7.5~8.0、至適温度は 35 °C であった。これに対して、*IhOMT2* はカフェ酸を含む種々のフェニルプロパノイドへの SAM 依存性 OMT アッセイにおいて、その活性が認められなかった。

先に述べた「White Wedgewood」および「Surprise」における *DFR* 遺伝子発現の欠損もしくは減少の原因を解明するために、両品種に「ブルーダイヤモンド」を加えた 3 品種を供試し、nested PCR および Inverse PCR によって *DFR* 構造遺伝子とその 5' 上流領域配列を単離・解析した。その結果、「ブルーダイヤモンド」から *gDFR-BD1* (1,968 bp) および *gDFR-BD2* (1,962 bp)、「White Wedgewood」から *gDFR-WW7* (1,957 bp)、*gDFR-WW13* (1,969 bp) および *gDFR-WW15* (1,966 bp) が、「Surprise」からは *gDFR-Su1* (1,958 bp) および *gDFR-Su2* (1,960 bp) の *DFR* 構造遺伝子が単離された。こ

これらのクローンは 1,086 bp の ORF をコードする 5 つのエクソンと 4 つのイントロンを有していた。「ブルーダイヤモンド」の *DFR* cDNA 配列との比較により、*DFR* 構造遺伝子内に発現の欠損、または減少につながるナンセンスおよびフレームシフト突然変異は存在しないことが示された。次に、3 つの品種の *DFR* 5' 上流領域配列として単離した *gDFR-BD5f2~4*、*gDFR-WW5f1~4* および *gDFR-Su1~3* のクローンの解析により、プロモーター領域に *Ty1-copia* 型 LTR レトロトランスポゾンと推定される挿入配列 (*rTyh1*) が見出された。「ブルーダイヤモンド」はプロモーター領域にレトロトランスポゾンの挿入を有するものと、挿入を持たないものの 2 種類が、一方、他の 2 品種はレトロトランスポゾンの挿入を持つもののみが検出された。このことから、「White Wedgewood」および「Surprise」における *DFR* 遺伝子発現の欠損または減少は、*DFR* 遺伝子のプロモーター領域へのレトロトランスポゾンの挿入に起因することが指摘された。

最後に、以上のアントシアニン生合成に関する分子遺伝学的成果を基にして、花色の育種戦略について論じた。